脱灰液

K-CX

使用ガイド

（取扱説明書）

FALMA 株式会社 ファルマ

K-CX®

ケーシー　エックス

脱灰液

使用説明書

K-CX を使用される前に必ず本書をお読みください。

目　次

1. はじめに ・・ 1
2. K-CX について ・・ 1
3. 時間設定について ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2
4. K-CX を用いた一般的な脱灰手順 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
5. K-CX の利用法について ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
6. K-CX を表面脱灰に用いる方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8
7. イヌ硬組織標本作製における「K-CX 低温希釈脱灰法」 ・・・・・ 9
8. K-CX 脱灰による特殊染色及び免疫組織化学染色の検討・・・・11
9. FAQ ・・14

1. はじめに

〔脱灰とは〕

骨・歯・石灰化病巣のような硬組織は薄切が非常に困難です。硬組織を薄切するためにあらかじめ脱灰操作を行います。

脱灰とは、一般的には組織から石灰分を取り除くことで、薄切可能な硬さまで変化させることをいいます。

2. K-CX について

〔特長〕

＊試験目的に応じて迅速脱灰とマイルド脱灰の両方に適用可能

＊脱灰による組織の歪みが少なく、微細構造を良好に再現

＊免疫組織化学染色及び特殊染色が可能（2 倍希釈／低温脱灰）

〔成分〕

塩酸、キレート剤　他

〔用法〕

原液または 2 倍希釈液を、常温（15～25℃）または低温（4～10℃）で使用します。

＊迅速脱灰法：	①原液／常温
	②2 倍希釈／常温
＊マイルド脱灰法：	①原液／低温（4～10℃）
	②2 倍希釈／低温（4～10℃）
＊免疫組織化学染色法、酵素抗体染色：	①2 倍希釈／低温（4～10℃）

〔脱灰のポイント〕

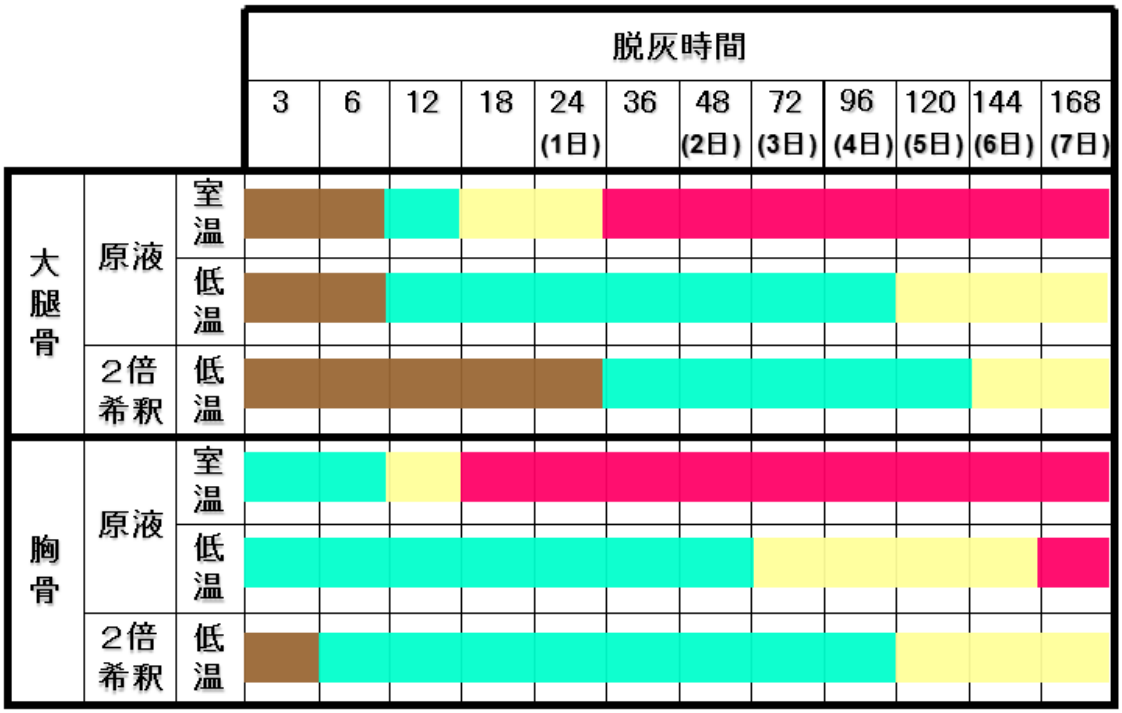
組織にダメージを与えないようにすること。

1. 組織はできるだけ小さくする。
2. 事前に脱脂処理を行う。（脱灰液の浸透を良くする。）
3. マイルドに脱灰する。（過脱灰になると、赤く染まりすぎる（核が染まらない）などの傾向が見られるため、低温脱灰（4～10℃）をお勧めします。）
4. あらかじめ K-CX を冷蔵庫で冷やす。
5. 脱灰完了ポイントを常時モニタリングする。（過脱灰防止）

3. 時間設定について

下記図表は、ラットを K-CX（原液／2 倍希釈）で脱灰した場合の至適脱灰時間を検討した結果です。この表を参考に仕様に合わせた至適時間をご設定ください。

（※参考文献より抜粋）



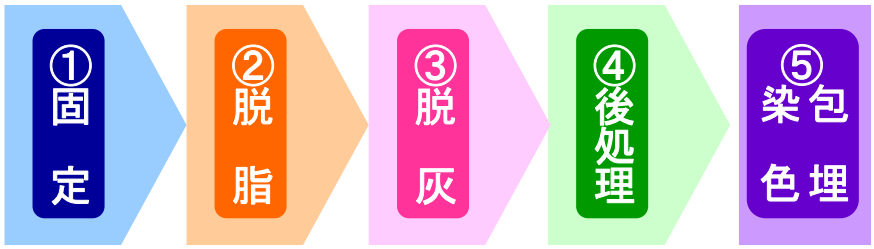
4. K-CX を用いた一般的な脱灰手順

■脱灰のポイント

・脱灰処理容器はポリ容器またはガラス容器を用いる。ステンレスを含め金属を脱灰液に浸けない。

・脱灰時、脱灰で溶出した無機塩は再沈着を防ぐため、組織を脱灰液の上層に吊るす。

■手順



(1) 固定

組織を十分に固定します。

＊固定液としてはホルムアルデヒド系(10%ホルマリン等)が適しています。

＊組織の厚さは最大 5mm 程度までとします。

(2) 脱脂

脱灰液の浸透性をよくするために脱脂を行います。以下の方法があります。

1:アルコールでの脱脂方法(①または②の方法があります。)

①90%エチルアルコール 1～3 日(脂肪分の量により、日数は適宜調整してください。)

② 上昇アルコール(70、80、90、100%)に浸し、十分脱脂後、下降アルコール(90、80、70%)を通して水に戻す。(全工程を約 1 日(＝24 時間)かけて行う。)

＜ポイント＞

＊上昇／下降アルコールは、それぞれ 12 時間が目安です。

＊上昇／下降アルコールとも、80%は長めの設定、特に上昇アルコールの 80%は overnight をお勧めします。

2:混合液での脱脂方法

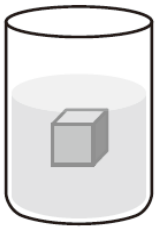
Ⅰ. 純エタノールに馴染ませる。

Ⅱ. キシレン 1:アルコール 3 の混合液に 30 分～数時間浸漬する。(脂肪が溶出して、黄色くなったら新しい液に交換してください。)
キシレンの代わりに Clear Plus 及び Hemo-De でも使用可能です。その場合は等量混合で 2 時間以上浸漬してください。

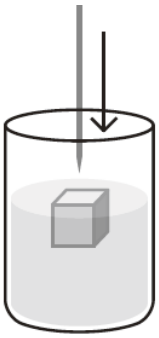
Ⅲ. 30 分程度、下降アルコール(100～70%)を通して水まで戻す。

（3）脱灰

固定された組織を K-CX に浸漬し、脱灰します。
（浸漬時間は温度、組織の種類、厚さにより異なります。）



＊脱灰液の液量は脱灰する組織の 50 倍量です。
＊溶出したカルシウム化合物の再沈着を防ぐため、2 日に 1 回新しい液と交換します。
＊脱灰時に、カルシウム再沈着を防ぐため、組織片を脱灰液の上層に置きます。
＊脱灰温度は常温または低温でご使用ください。
＊脱灰処理容器は、ポリ容器またはガラス容器を用いてください。ステンレスを含め金属を脱灰液に浸けないでください。
＊大きい硬組織は K-CX に所定時間浸漬した後、適当な大きさに切断し、K-CX に戻してさらに 12～16 時間程度（適宜延長あるいは短縮）浸漬します。



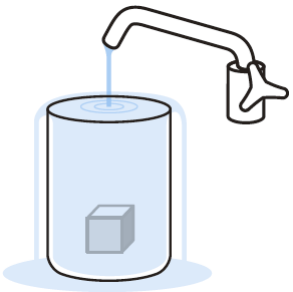
脱灰が完了したかどうかは、組織片に針を刺すなどして確認してください。抵抗がなくなれば終了です。

（4）脱灰後の処理

以下 2 つの方法があります。

方法 1. 中和
5%硫酸ナトリウム液に入れて 12～24 時間浸漬し、その後水洗する。

方法 2. 水洗
比較的短時間で脱灰が完了する小動物や軟組織等では中和せず、水洗のみで処理が可能です。（組織の状態に応じて 5 時間～半日）
＊強い水流は、組織にダメージを与えるため、できるだけ穏やかな水流での水洗が望ましい。



（5）包埋・染色

脱灰後の処理を終了後、通常の包埋・染色工程に移ります。
＊包埋工程に移らない場合は、組織を固定液に戻してください。

5. K-CX の利用法について

〔 ① ヒト組織での使用例 〕

K-CX を利用頂いているお客様の使用例をご紹介します。
原液での利用材料、2 倍希釈液での利用材料の一例です。

■原液での利用法一例

・骨組織を含む材料（骨頭等）、**メスの刃が刃こぼれするような材料**

脱灰の完了具合を確認してから水洗に移ります。
3 日以上脱灰液に入れた材料は中和液に入れてから水洗します。

■2 倍希釈液での利用法一例

①切り出し終了後、水洗までカセットに入れたまま、K-CX の中に入れておく材料

- 骨髄生検
- 口腔外科領域の軟組織（歯根嚢胞等）
- 耳鼻科領域の軟組織（鼻茸等）
- 肺手術材料切り出し時の気管支
- 甲状腺、前立腺手術材料で石灰化（メスで切れる程度）のあるもの
- 角化の強い皮膚（かかと等）
- その他、石灰化した小組織

②一晩 K-CX に入れたほうが良い材料

- 前立腺 TUR：十分に固定が完了したら全量をネットに入れ、軽く水洗後ネットごと瓶に入れる
- 剖検の脊髄材料

〔 ② 動物大腿骨の脱灰方法　手順一例 〕

■動物大腿骨の脱灰におけるポイント

＊ポイント：大きい動物の大腿骨脱灰の場合は、一度に最終段階まで進めるのではなく、脱灰と整形を段階的に繰り返す。

ギ酸ホルマリンでは容易に脱灰できない組織や、早急に脱灰標本を作製しなければならない場合に K-CX を使用すると便利です。

■手順

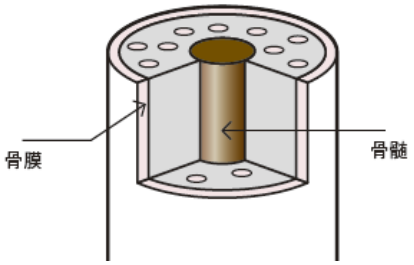
（1） 脱灰液の調製

動物大腿骨の場合は、原液又は 2 倍希釈液を脱灰液として準備します。

（2） 組織の準備

＊大腿骨に付着した余分な組織を除去します。

＊骨組織の骨膜を痛めすぎないように注意してください。



（3） 固定

10％ホルマリンに浸漬し、固定を行います。

＊小動物（ラット、マウス）は普通のメスでは刃が入らないため、カットせずにそのまま固定します。

＊大動物（イヌなど）は大きすぎて固定できないため、あらかじめ電動のこぎりやバンドソー等でカットし、固定します。

（4） 脱脂

P.3 に従う

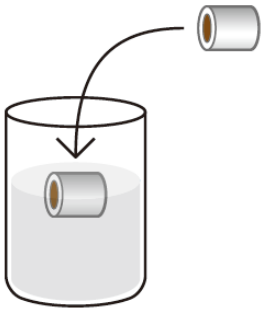
(5) 脱灰

★過脱灰を避けるため、低温脱灰をお勧めします。

＜低温脱灰処理を行う場合＞

＊ 原液・2 倍希釈の低温脱灰の場合：短時間で脱灰が完了し、その後、長時間にわたり染色性が安定します。（ラットの大腿骨例：2 倍希釈の場合 24 時間～5 日）

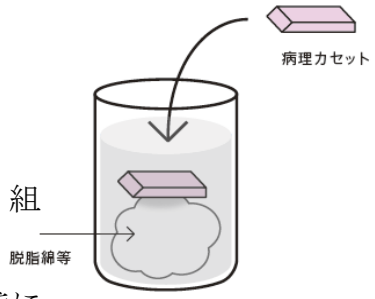
＊ 脱灰時間は P.2 至適脱灰条件を検討した図表を参照



＜常温脱灰処理を行う場合＞

＊ 原液・2 倍希釈で常温の場合：短時間で脱灰するため、過脱灰にならないように注意してください。

＊脱灰液は 2 日に 1 回交換してください。

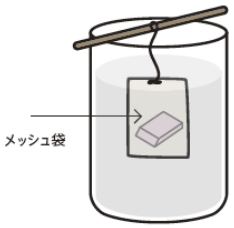


【脱灰操作時のサンプルの扱い方】

硬組織から溶出したカルシウム等が下層に集積するので、組織は中層から上層になるように工夫してください。

病理カセットに収まる大きさにできなかった時は、メッシュ袋に入れ脱灰液上層へ位置するように吊り下げるなどしてください。

脱灰の終了確認のため、少なくとも 1 日 2 回程度、針もしくは刃を入れて脱灰の進み具合を確認します。針で刺して、抵抗がなくなれば終了です。



(6) 脱灰後の処理

脱灰終了後の組織は流水にて半日以上水洗または中和処理を行います。その後、包埋・染色工程に移ります。

（P.4 の「(4) 脱灰後の処理」を参照）

(7) 包埋・染色

脱灰後の処理を終了後、通常の包埋・染色工程に移ります。

※包埋工程に移らない場合は、組織を固定液に戻してください。

6. K-CX を表面脱灰に用いる方法

＜方法＞

1. シャーレに濾紙を敷き、濾紙がひたひたになるくらいに K-CX　2 倍希釈液を入れます。
2. その上に面出ししたブロックを置きます。濾紙が乾いたら液を足して使用できます。再度薄切するときは、必ずブロックを水洗してから切ってください。水洗しないと刃が錆びます。

＜所要時間の目安＞

・薄切時、切片が分かれない程度のもの:　　30 分～2 時間

・切片が分かれるほど硬い石灰化のあるもの: 3～4 時間

7. イヌ硬組織標本作製における「K-CX 低温希釈脱灰法」

イヌの脊椎や鼻腔等は、マウス等に比較して組織が大きく硬組織のため脱灰が困難ですが、K-CX 低温希釈での脱灰で良好な結果が得られています。(文献 1)

- ■ 検討条件(検討脱灰液)
- ■ HE 染色での検討結果
- ■ 薄切面での検討結果
- ■ まとめ(表)
- ■ 補足:脱灰処理後のパラフィン包埋条件

■検討条件(検討脱灰液)

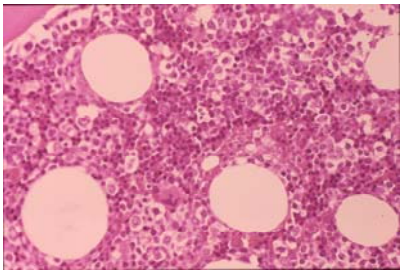
検討脱灰液の組成

【条件 1】	ギ酸・ホルマリン液 (10%ギ酸:10%ホルマリン=1:1)	室温	9 日
【条件 2】	ギ酸・クエン酸液 (50%ギ酸:20%クエン酸=1:1)	室温	6 日
【条件 3】	希釈 K-CX 液 (市販品の 2 倍希釈)	8℃	6 日

■HE 染色での検討結果

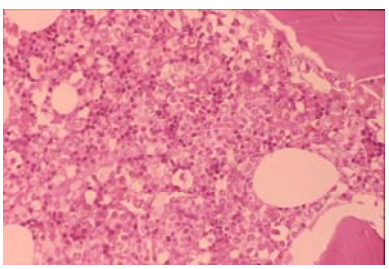
これら 3 種を用いて得られた脱灰後の結果を以下に示します。
条件 1~3 で処理後の HE 染色では、ほぼ同等の結果が得られました。

【条件 1】



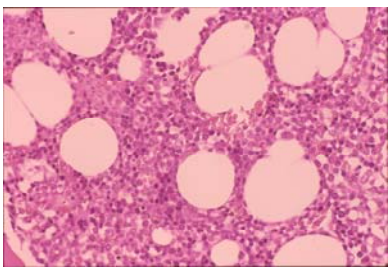
ギ酸・ホルマリン液処理での検討結果

【条件 2】



ギ酸・クエン酸液処理での検討結果

【条件 3】



希釈 K-CX 処理での検討結果

■薄切面での検討結果

薄切の容易さでは、K-CX の低温希釈脱灰法が一番薄切しやすいことが分かりました。
（下図参照）

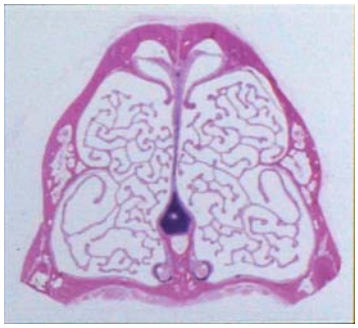
【条件 1】

ギ酸・ホルマリン液処理での
検討結果

【条件 2】

ギ酸・クエン酸液処理での
検討結果

【条件 3】



希釈 K-CX 処理での
検討結果

■まとめ（表）

脱灰液	脱灰時間	薄切（難易度）			染色性
		鼻　腔	上腕骨	腰　椎	
ギ酸・ホルマリン液	室温　9 日間	普通	普通	普通	良
ギ酸・クエン酸液	室温　6 日間	普通	普通	普通	良
希釈 K-CX 液	**8℃　6 日間**	**良好**	**良好**	**良好**	**良**

■補足：脱灰処理後のパラフィン包埋条件

No.	溶液	時間（hrs）
1	アルコール　70%	1.5
2	アルコール　80%	1.5
3	アルコール　90%	1.5
4	アルコール　95%	1.5
5	アルコール100%	1.5
6	アルコール100%	2
7	アルコール100%	2
8	Hemo-De	1.5
9	Hemo-De	2
10	Hemo-De	2
11	パラフィン	1.5
12	パラフィン	1.5
13	パラフィン	2
合計時間		22

8. K-CX 脱灰による特殊染色及び免疫組織化学染色の検討

（参考資料 2 より抜粋）

■検討条件

■特殊染色での検討結果

■免疫組織化学染色での検討結果

■まとめ

■検討条件

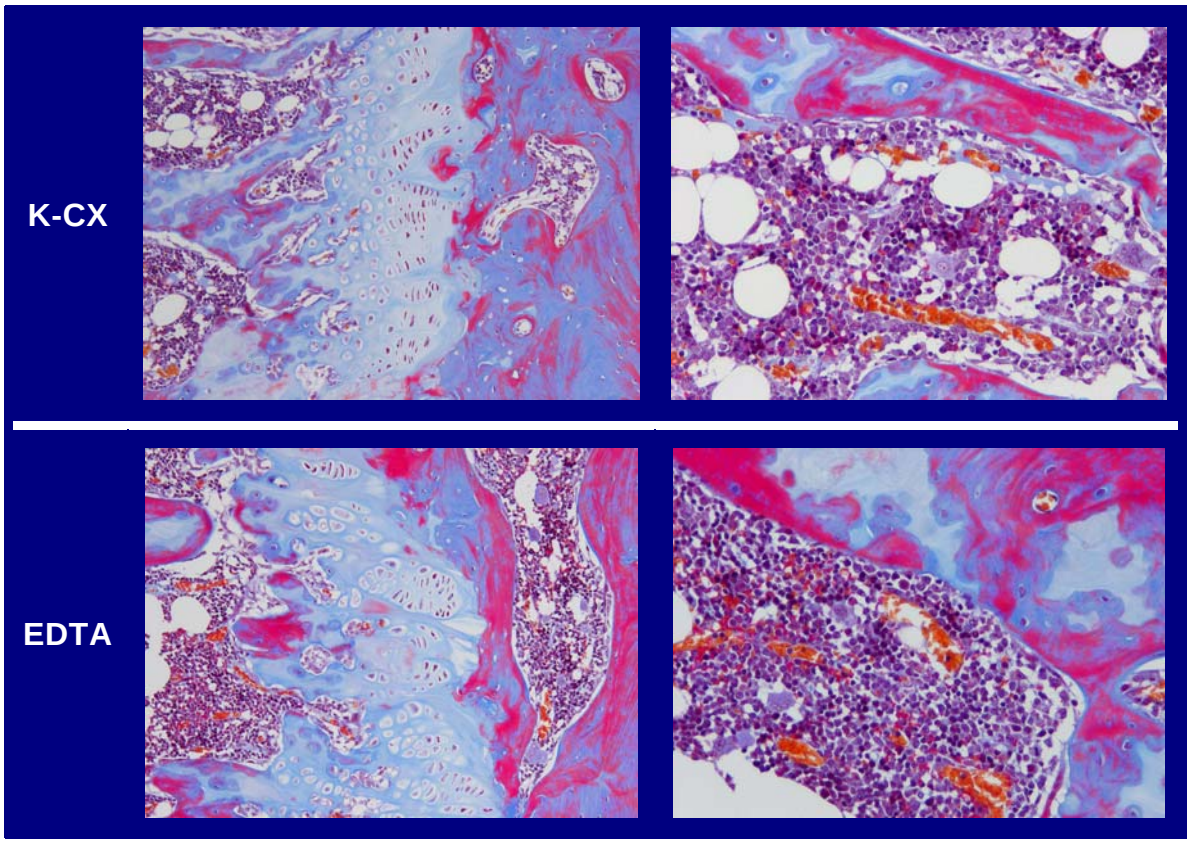
・検体の種類：ラット大腿骨（10%リン酸緩衝ホルマリン液で 3 日以上固定したもの）

・検討脱灰液

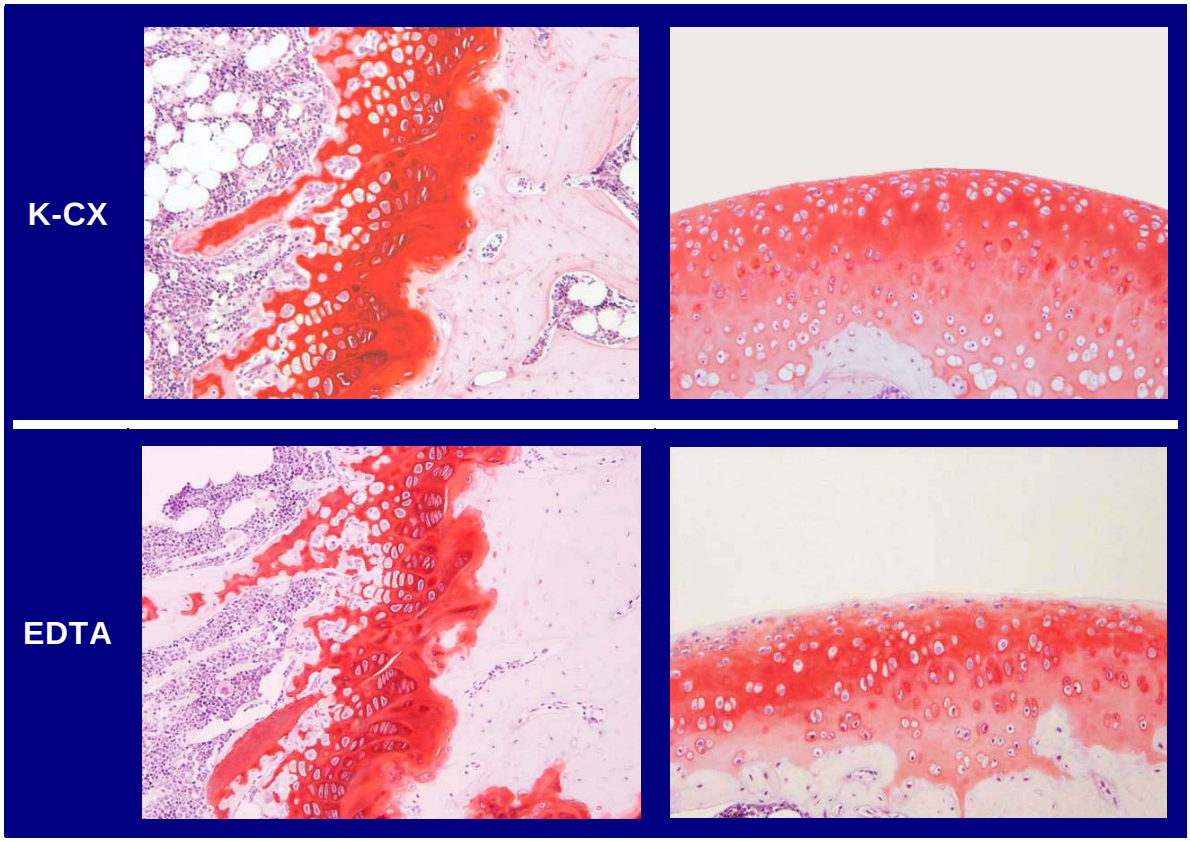
K-CX 脱灰液　2 倍に希釈したもの	低温	36 時間脱灰
10%EDTA 脱灰液	室温	14 日間脱灰

■特殊染色　検討結果

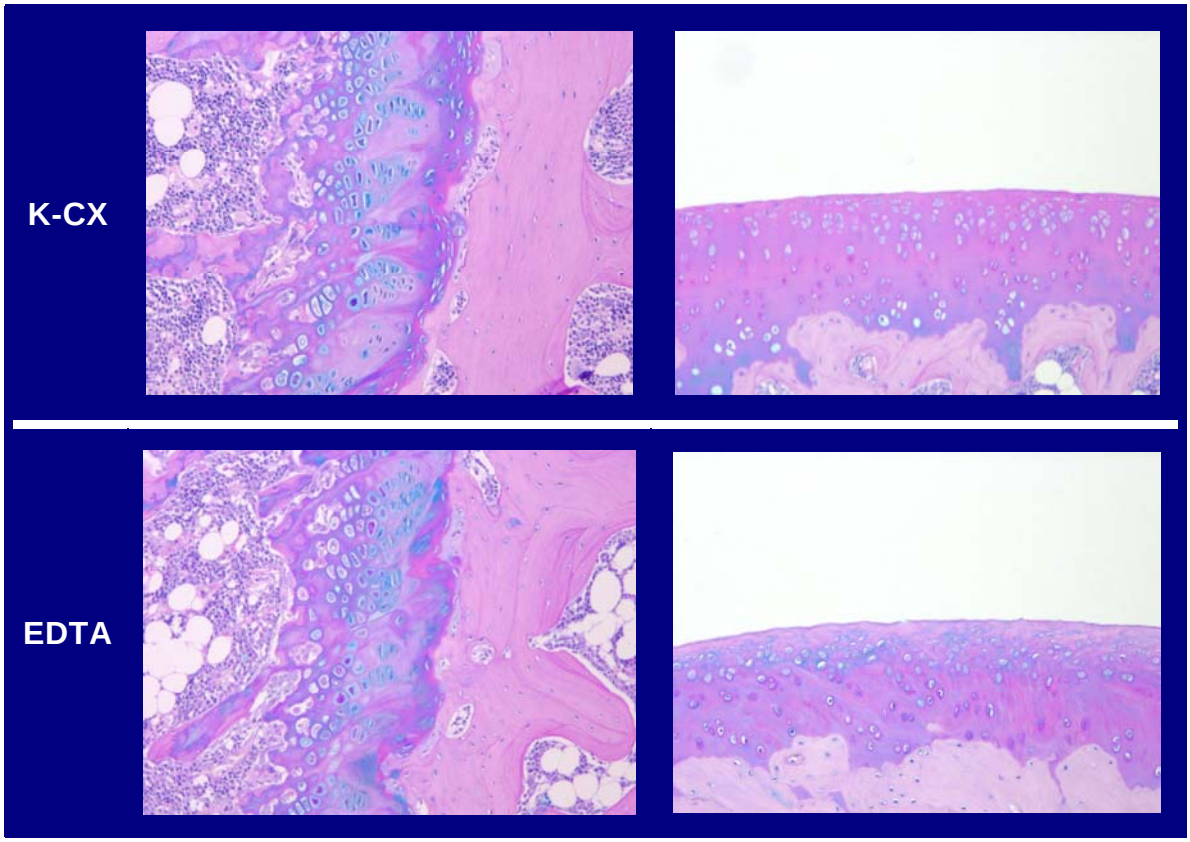
＊マッソントリクローム染色＊　（軟骨）



＊サフラニン O 染色＊（軟骨）

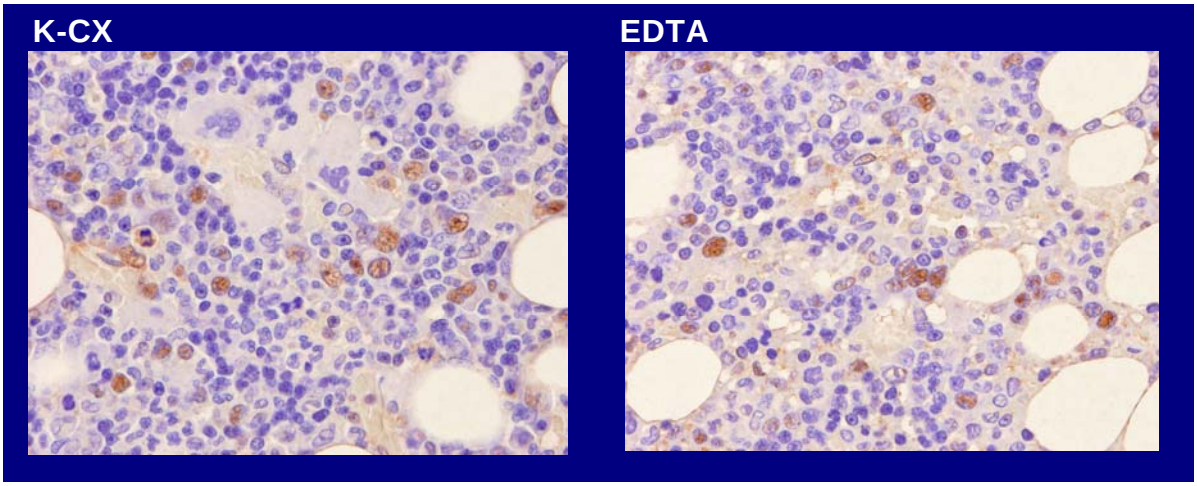


＊アルシアンブルーPAS 染色＊（軟骨）

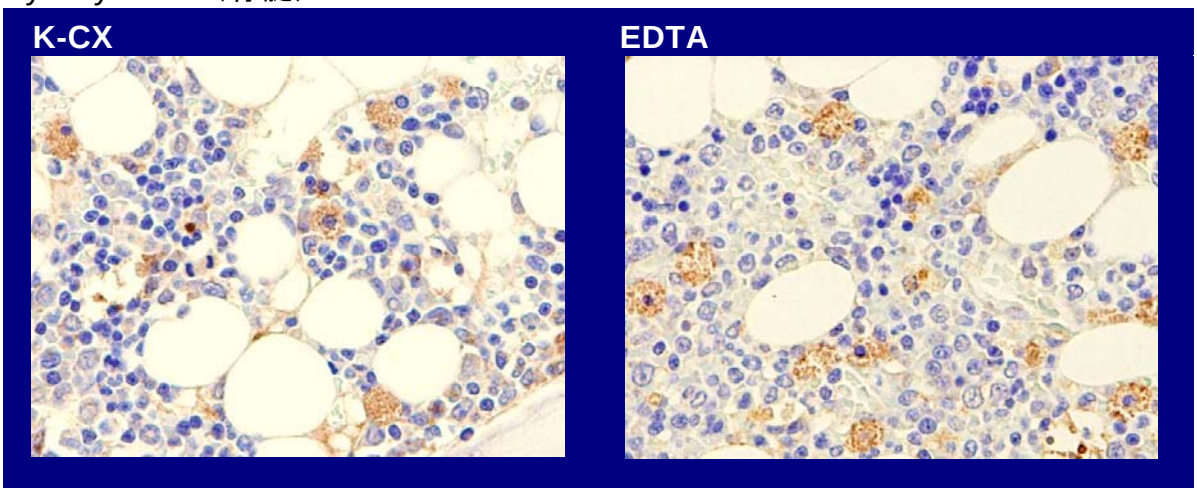


■免疫組織化学染色　検討結果

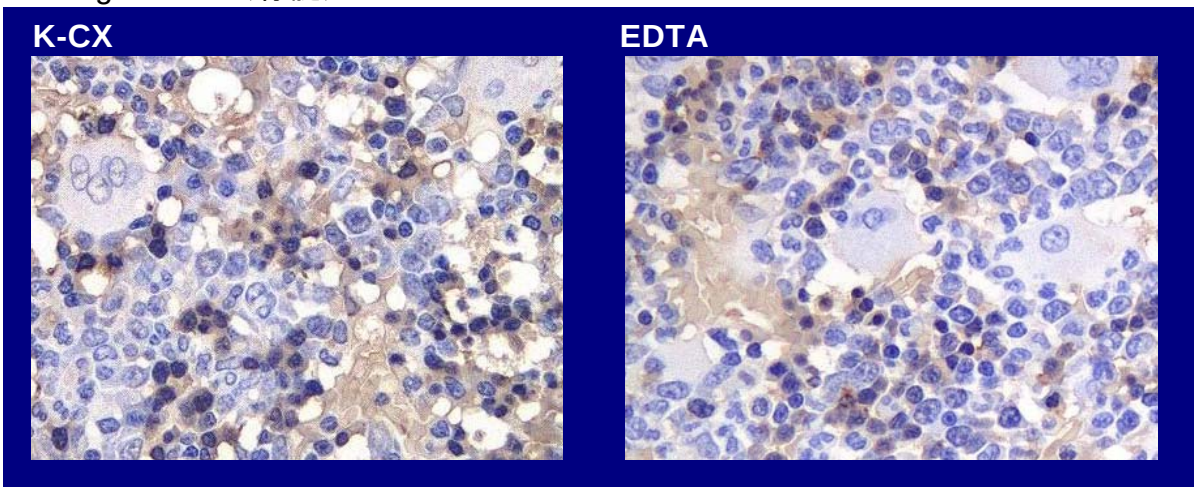
＊PCNA＊　（骨髄）



＊Lysozyme＊　（骨髄）



＊Hemoglobin＊　（骨髄）



■まとめ

脱灰液	脱灰条件	染色性
K-CX	低温（6～8℃）36 時間	良
EDTA	室温　14 日間	良

9. FAQ

廃棄方法

【方法】

（1）10L 以上入るタンクまたはバケツを用いて、K-CX　1L を水道水で 10 倍希釈します。

（2）そこに 1N 水酸化ナトリウム水溶液（およそ 1.4L）を徐々に加えて攪拌し、中和します。最終的な pH はリトマス試験紙で確認してください。

（3）中和処理したものは、大量の水で希釈してから下水に流してください。

【廃棄するにあたって】

・保護手袋を着用してください。
・換気の良い場所で行ってください。
・K-CX　1L を処理するための方法を案内しておりますが、もし、K-CX を 3L 以上廃棄する場合は、専門の廃棄業者に依頼されることをお勧めします。

貯蔵方法

光と熱を避け、密栓して室温保存してください。

製品情報

＜商品コード＞	＜包装＞
CS-5151	1L×1 本
CS-5151×4	1L×4 本

取扱上の注意

【安全対策】

・すべての安全注意を読み理解するまで取り扱わないこと。
・使用前に取扱説明書を入手すること。
・この製品を使用する時に、飲食又は喫煙をしないこと。
・個人用保護具や換気装置を使用し、ばく露を避けること。
・保護手袋、保護衣、保護眼鏡、保護面を着用すること。
・取扱い後はよく手を洗うこと。
・環境への放出を避けること。
・K-CXを温めて使用しないこと。

【応急措置】

・眼に入った場合、水で数分間、注意深く洗うこと。コンタクトレンズを容易に外せる場合には外して洗うこと。医師の診断、手当を受けること。
・皮膚又は毛髪に付着した場合、多量の水と石鹸で洗い、医師の診断、手当を受けること。
・飲み込んだ場合、直ちに口をすすぎ、医師の診断、手当を受けること。
・気分が悪いときは、医師の診断、手当を受けること。
・取り扱った後、手を洗うこと。
・漏出物は回収すること。

参考文献（ご入用の方はご請求ください。）

文献1:（株）ボゾリサーチセンター,“イヌ硬組織（上腕骨・脊椎・鼻腔）の標本作製における脱灰液の検討”，実験病理組織技術研究会　第9回総会・学術集会,2002

参考資料1:（株）ボゾリサーチセンター,“脱灰による骨組織の染色性に及ぼす影響―ギ酸ホルマリン液、ギ酸クエン酸液及びK-CX液の比較―”，実験病理組織技術研究会　第11回総会・学術集会,2003

参考資料 2:（株）ボゾリサーチセンター,“ラットの骨組織を用いた K-CX 脱灰液の至適脱灰条件と組織染色性に関する検討”,実験病理組織技術研究会　第 16 回総会・学術集会,2009

お気軽にお問い合わせください。

発売元　株式会社 ファルマ

東京営業所
〒151-0065　東京都渋谷区大山町36-7
TEL 03(6407)2570　FAX 03(3465)0300
大阪営業所
〒532-0003 大阪市淀川区宮原5-1-3新大阪生島ビル
TEL 06(6397)2411　FAX 06(6397)2852
http://www.falma.co.jp

2014 年 9 月　第 5 版発行